

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-253168  
 (43)Date of publication of application : 21.09.1999

(51)Int.Cl.  
 C12N 15/09  
 C07K 14/195  
 C12N 1/21  
 C12N 9/88  
 C12P 13/02  
 // (C12N 15/09  
 C12R 1:01 )  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:19 )

(21)Application number : 10-065520  
 (22)Date of filing : 16.03.1998

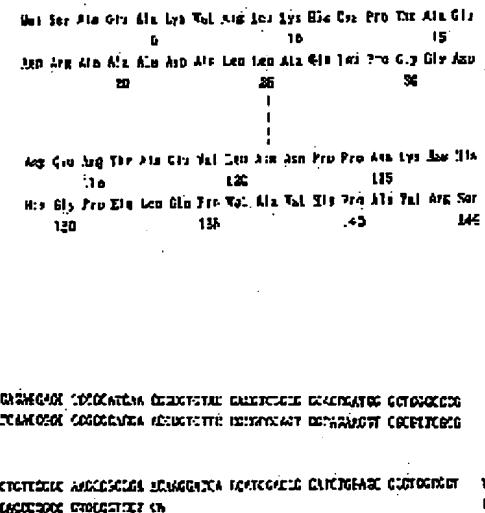
(71)Applicant : MITSUI CHEM INC  
 (72)Inventor : ITO KIYOSHI  
 TSURUOKA MIYUKI  
 SUZUKI TADASHI  
 SHISHIMARU SEIYA  
 NAKAMURA TAKESHI

## (54) PROTEIN INVOLVING IN ACTIVATION OF NITRILE HYDRATASE, AND GENE CODING FOR THE SAME

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a protein which allows efficient production of an amide from a corresponding nitrile by contributing to activation of a nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095.

**SOLUTION:** This protein contributes to activation of a nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095, and consists of an amino acid sequence shown by formula I. It is preferable to produce an amide from a corresponding nitrile by culturing a transformant which carries a recombinant plasmid having a gene coding for the protein, or a base sequence at position 1328–1762 shown by formula II, followed by contacting cells of the transformant obtained by culturing, culture broth, and a material obtained by treating these, with a nitrile (e.g. acetonitrile) in an aqueous medium.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.04.1999  
 [Date of sending the examiner's decision of rejection] 19.11.2002  
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
 [Date of final disposal for application]  
 [Patent number] 3408737  
 [Date of registration] 14.03.2003  
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2002-24319

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-253168

(43)公開日 平成11年(1999)9月21日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 N 15/09  
C 07 K 14/195  
C 12 N 1/21  
9/88  
C 12 P 13/02

識別記号

ZNA

F I

C 12 N 15/00  
C 07 K 14/195  
C 12 N 1/21  
9/88  
C 12 P 13/02

ZNAA

審査請求 有 請求項の数12 OL (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平10-65520

(71)出願人 000005887

三井化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(22)出願日

平成10年(1998)3月16日

(72)発明者 伊藤 深

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式  
会社内

(72)発明者 鶴岡 みゆき

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式  
会社内

(72)発明者 鈴木 正

千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式  
会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ニトリルヒドラターゼの活性化に関するタンパク質及びそれをコードする遺伝子

(57)【要約】

【課題】 シュードノカルディア・サーモフィラ JCM 3095 (Pseudonocardia thermophila JCM3095) 由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関するニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子を有する組換えプラスミドを構築し、該組換えプラスミドで大腸菌を形質転換し、該大腸菌内でニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子と共に発現させる。

【効果】 遺伝子工学的な手法で該酵素を大量に発現させることが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (Pseudonocardia thermophila JCM3095) 由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関する特徴とするタンパク質。

【請求項2】 配列表の配列番号：1記載のアミノ酸配列により構成されることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 シュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (Pseudonocardia thermophila JCM3095) 由来であることを特徴とする請求項1または請求項2に記載のタンパク質。

【請求項4】 請求項1から請求項3に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項5】 配列表の配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列で表される請求項4に記載の遺伝子。

【請求項6】 請求項4または請求項5に記載の遺伝子を含んでいることを特徴とする組換えプラスミド。

【請求項7】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子を構成要素として含んでいることを特徴とする請求項6に記載の組換えプラスミド。

【請求項8】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子がシュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (Pseudonocardia thermophila JCM3095) 由来であることを特徴とする請求項7に記載の組換えプラスミド。

【請求項9】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子が配列表の配列番号：2に記載の714番目から1331番目までの塩基配列で表される $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子を構成要素として含んでいることを特徴とする請求項7に記載の組換えプラスミド。

【請求項10】 ニトリルヒドラターゼ遺伝子が配列表の配列番号：2に記載の16番目から717番目までの塩基配列で表される $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子を構成要素として含んでいることを特徴とする請求項7に記載の組換えプラスミド。

【請求項11】 請求項6から請求項10に記載のいずれかの組換えプラスミドを保持する形質転換株。

【請求項12】 請求項7から請求項10に記載のいずれかの組換えプラスミドを保持する形質転換株を培養し、培養によって得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物とニトリル化合物とを水性媒体中で接触させて該ニトリル化合物に対応するアミド化合物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、シュードノカルディア・サーモフィラ JCM3095 (Pseudonocardia thermophila JCM3095、以下単にシュードノカルディア・サーモフィラと呼ぶ) 由来のニトリルヒドラターゼの活

性化に関するタンパク質及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに、本発明は、該遺伝子を含有する組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラターゼ遺伝子を含有する組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株及び該形質転換株を培養して得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、種々の化合物のニトリル基を水和しアミド基に変換するニトリル水和活性を有する酵素であるニトリルヒドラターゼが発見され、該酵素を產生する微生物株が多数開示されている。ニトリルヒドラターゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造するためには、アミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストを下げる事が重要であり、より具体的には単位微生物重量あたりの該酵素含有量を高くる必要がある。そこで、該酵素の遺伝子を用いて遺伝子工学の手法により該酵素を大量に発現させることを目的として、該酵素の遺伝子をクローニングする試みが検討されている。

【0003】 本発明者らは、ニトリルヒドラターゼ活性を有する微生物としてシュードノカルディア・サーモフィラを見出した(特開平8-56684)。また、本発明者らは、同株よりニトリルヒドラターゼを単離し、同酵素が $\alpha$ サブユニットおよび $\beta$ サブユニットより構成されることを確認した。さらに、同株よりニトリルヒドラターゼ遺伝子を単離し、そのアミノ酸配列および遺伝子配列を明らかにするとともに、該遺伝子を大腸菌内で大量に発現できる遺伝子組換えプラスミドおよび同プラスミドにより形質転換された形質転換大腸菌株を作出することにも成功している(特開平9-275978)。尚、シュードノカルディア・サーモフィラであるが、本菌株は理化学研究所微生物系統保存施設(埼玉県和光市広沢2-1)に番号JCM3095として保管され、何人にも請求により自由に分譲される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、特開平9-275978記載のシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼを大腸菌内で大量に発現させることができない遺伝子組換えプラスミド(pPT-D B1)の詳細な解析により判明した該酵素の活性化に関するタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラターゼ遺伝子を含有する組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株及び該形質転換株を培養して得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法を提供することである。

### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、特開平9-275978記載のMT-10822株に導入されている遺伝子組換えプラスミドpPT-DB1上のシュードノカルディア・サーモフィラ由来のDNA断片の塩基配列を詳細に解析した。その結果、以下の1~5の知見を得るに至った。第一に、pPT-DB1上にニトリルヒドラターゼ構造遺伝子（ $\alpha$ および $\beta$ サブユニット構造遺伝子）とは異なる第3のオープンリーディングフレーム（以下、ORF3と呼称する）が該DNA断片上に存在し、ORF3が分子量約15900のタンパク質をコードしていることを見出した。第二に、pPT-DB1上の $\alpha$ サブユニットのオープンリーディングフレーム（以下、ORF2と呼称する）、 $\beta$ サブユニットのオープンリーディングフレーム（以下、ORF1と呼称する）およびORF3のみがクローニングされたプラスミドpPT-D1を作製し、同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌がニトリルヒドラターゼ活性を有していることを確認した。第三に、pPT-DB1よりORF1およびORF2のみを有する遺伝子組換えプラスミドpPT-F1を構築した。同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌のニトリルヒドラターゼ活性を測定した結果、同大腸菌からはニトリルヒドラターゼ活性が検出されなかった。一方、菌体内には、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットに相当するポリペプチド鎖の存在が確認された。第四に、pPT-DB1より、ORF3領域のみがクローニングされたプラスミドpPT-G1を作製し、同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌にはニトリルヒドラターゼ活性が見いだされないことを確認した。第五に、pPT-F1より、lacZプロモーター、ORF1およびORF2を含む領域をPCRにより增幅し、得られた増幅DNA断片をpPT-G1のORF3の3'末端側下流に再クローニングしたプラスミドpPT-H1を作製した。同プラスミドで形質転換した形質転換大腸菌のニトリルヒドラターゼ活性を測定した結果、該大腸菌にはニトリルヒドラターゼ活性が検出された。

【0006】以上の知見より、本発明者らは、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼが導入された大腸菌が同活性を示すためには、ORF3領域の存在が必須であり、さらに、上記の第二、第三および第五の知見を併せるとORF3の翻訳産物の存在が必須であると結論した。また、同酵素が $\alpha$ サブユニットおよび $\beta$ サブユニットにより構成されること（特開平9-275978）、および、ORF1~3の3種類のオープンリーディングフレームを含む最小のDNA断片を大腸菌に導入した場合でも遺伝子組換え大腸菌がニトリルヒドラターゼ活性を示すこと（上記の第二の知見）より、ORF3の翻訳産物は、該ニトリルヒドラターゼの活性化に関与していると結論した。すなわち、ORF3は、シュードノカルディア・サーモフィラ由来の

ニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子座であると結論し、本願発明を完成させるに至った。

【0007】すなわち、本発明は、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質およびそれをコードする遺伝子配列を提供するものである。さらに、本発明は、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラターゼ遺伝子を含有する組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株、及び、該形質転換株を培養して得られた形質転換株、培養液、およびそれらの処理物を用いて、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法を提供するものである。

### 【0008】

【発明実施の形態】以下、本発明の詳細について説明する。

【0009】本発明におけるシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質（以下、単にニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質と呼称する）とは、前述の課題を解決するための手段および後述の実施例のように、該タンパク質の発現の有無がシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化を直接左右する性質を有しているタンパク質のことである。

【0010】本発明におけるニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質とは、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のものをその代表例として挙げることができる。尚、近年の分子生物学および遺伝子工学の進歩により、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質の分子生物学的な性質やアミノ酸配列等を直接参考にすることにより、該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をシュードノカルディア・サーモフィラとは全く別個の微生物株より取得することが可能となり、かつ、比較的容易にもなった。かかる技術水準に鑑み、シュードノカルディア・サーモフィラ以外の微生物株由来であっても、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質は、本発明に包含されるものとする。そのような微生物株としては、ノカルディア(Nocardia)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、バチルス(Bacillus)属、好熱性のバチルス属、シュードモナス(Pseudomonas)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属、ロドクロロウス(rhodochrous)種に代表されるロドコッカス(Rhodococcus)属、アシネットバクター(Acinetobacter)属、キサントバクター(Xanthobacter)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、リゾビウム(Rhizobiium)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、エルウィニア(Erwinia)属、エアロモナス(Aeromonas)属、シトロバクター(Citrobacter)

属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属またはサーモフィラ(*thermophila*)種JCM3095株以外のシードノカルディア(*Pseudonocardia*)属に属する株を好適な例として挙げることができる。

【0011】本発明におけるニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質とは、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列により構成されるものをその代表例として挙げることができる。また、同じ塩基配列の遺伝子を鋳型として転写・翻訳された場合であっても、それを導入する宿主の種類、培養に使用する栄養培地の成分や組成、培養時の温度やpH等によっては、宿主内酵素による翻訳後の修飾などにより、所期の機能は保持しているものの配列表におけるN末端付近のアミノ酸の1個または2個以上が消失したり、N末端に1個または2個以上のアミノ酸が新たに付加した部分変異タンパク質を產生することがある。さらに、組換えDNA技術の進歩によりタンパク質の機能を実質的に変えることなく比較的容易にその構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、消失、削除もしくは挿入できるようになつた。かかる技術水準に鑑み、この発明でいうニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質とは、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列をそのまま具備するものは言うにおよばず、1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換、消失、削除もしくは挿入されたアミノ酸配列を有する部分変異タンパク質であっても、それがシードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与する場合は本発明に含まれるものとする。

【0012】すなわち、本発明は、配列表の配列番号：1に示される144個のアミノ酸の配列により構成されるニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質である。また、本発明においては、配列表の配列番号：1に示されるアミノ酸配列の一部が置換、消失、削除または挿入して得られた部分変異タンパク質であり、かつ、シードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与する場合には、本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質に含まれるものとする。

【0013】本発明におけるニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質とは、シードノカルディア・サーモフィラ由来であり、かつ、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列により構成されるものをその代表例として挙げることができる。また、近年の遺伝子工学の進歩により、シードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質のアミノ酸配列を直接参考にすることにより、該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をシードノカルディア・サーモフィラとは全く別個の微生物株より取得することが可能となり、かつ、比較的容易にもなつた。かかる技術水準に鑑み、シードノカルディア・サーモフィラ以外の微生

物株由来であり、配列表における配列番号：1に示すアミノ酸配列をそのまま具備する場合または1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換、消失、削除もしくは挿入されたアミノ酸配列を有する場合であつて、かつ、シードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与する場合には、該タンパク質は、本発明に包含されるものとする。そのような微生物株としては、ノカルディア(*Nocardia*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、バチルス(*Bacillus*)属、好熱性のバチルス属、シードモナス(*Pseudomonas*)属、ミクロコッカス(*Micrococcus*)属、ロドクロウス(*rhodochrous*)種に代表されるロドコッカス(*Rhodococcus*)属、アシネットバクター(*Acinetobacter*)属、キサントバクター(*Xanthobacter*)属、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属、リゾビウム(*Rhizobium*)属、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、エルウィニア(*Erwinia*)属、エアロモナス(*Aeromonas*)属、シトロバクター(*Citrobacter*)属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属またはサーモフィラ(*thermophila*)種JCM3095株以外のシードノカルディア(*Pseudonocardia*)属に属する株を好適な例として挙げることができる。

【0014】本発明においては、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の配列が含まれる。本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とは、本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、本発明の範囲に含まれるものとする。

【0015】本発明においては、配列表の配列番号：1に示される144個のアミノ酸の配列をコードする塩基配列は、本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の範囲に含まれる。また、本発明においては、配列表の配列番号：1に示されるアミノ酸配列の一部が置換、消失、削除または挿入して得られる部分変異タンパク質であり、かつ、シードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与する場合には、該部分変異タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列も本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の範囲に含まれるものとする。

【0016】本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とは、配列表の配列番号2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列をその代表例として挙げることができる。また、組換えDNA技術の進歩によりタンパク質のアミノ酸配列を実質的に変えることなく比較的容易に翻訳の際の鋳型となるDNAの塩基配列を他の塩基配列で置換できるようになった。さらに、翻訳の際の鋳型となるDNAの塩基配列を置換、消失、削除もしくは挿入することにより、タン

パク質の機能を実質的に変えることなくその構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除または挿入させることもできるようになった。かかる技術水準に鑑み、この発明でいうニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とは、配列表における配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列をそのまま具備するものは言うによらず、そのDNA塩基配列の1個または2個以上の塩基が他の塩基に置換、欠失、削除もしくは挿入された部分変異配列であっても、それがショードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質の錠型として機能する場合には、本発明に包含されるものとする。

【0017】すなわち、本発明は、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子であって、配列表の配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列により構成されるものを含んでいる。また、本発明においては、配列表の配列番号：2に記載の1328番目から1762番目までの塩基配列の一部を置換、欠失、削除または挿入して得られる塩基配列を有する遺伝子であって、該遺伝子がコードするタンパク質がショードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与する場合には、本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子に含まれるものとする。

【0018】本発明においては、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子が挿入された組換えプラスミドを構築することが含まれる。より具体的には、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子が該遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域を含むプラスミドベクターに挿入されたプラスミドのことである。

【0019】発現に必要な制御領域とは、プロモーター配列（転写を制御するオペレーター配列を含む）・リボソーム結合配列（SD配列）・転写終結配列等を示している。プロモーター配列の具体例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンのtrpプロモーター・ラクトースオペロンのlacプロモーター・ラムダファージ由来のPLプロモーター及びPRプロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター(gnt)・アルカリプロテアーゼプロモーター(apr)・中性プロテアーゼプロモーター(npr)・α-アミラーゼプロモーター(amy)等が挙げられる。また、lacプロモーターのように独自に改変・設計された配列も利用できる。リボソーム結合配列としては、本発明のショードノカルディア本来の配列や大腸菌由来または枯草菌由来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。たとえば、16SリボソームRNAの3'末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列

をDNA合成により作成してこれを用いてもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、ρ因子非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター・trpオペロンターミネーター等が利用できる。これら制御領域の組換えプラスミド上での配列順序は、5'末端側上流からプロモーター配列、リボソーム結合配列、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子、転写終結配列の順に並ぶことが望ましい。

【0020】プラスミドベクターの具体例としては、大腸菌中の自律複製可能な領域を有しているpBR322、pUC18、Bluescript II SK (+)、pKK223-3、pSC101や、枯草菌中の自律複製可能な領域を有しているpUB110、pTZ4、pC194、ρ11、ϕ1、ϕ105等を挙げることができる。また、2種類以上の宿主内での自律複製が可能なプラスミドベクターの例として、pHV14、TRP7、YEP7及びpBS7を挙げができる。

【0021】本発明においては、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とニトリルヒドラターゼ遺伝子が同時に挿入された組換えプラスミドを構築することが含まれる。すなわち、両遺伝子が両遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域を含むプラスミドベクターに挿入された組換えプラスミドのことであり、該組換えプラスミドが任意の宿主に導入されることにより、該酵素の产生および活性化が可能となる組換えプラスミドのことである。具体的には、前述と同じ発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域を含むプラスミドベクターを選択すればよい。また、その様な制御領域によりニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子、ニトリルヒドラターゼのαサブユニット遺伝子及びβサブユニット遺伝子が各々独立のシストロンとして発現されていてもよいし、共通の制御領域によりポリシストロンとして発現されていてもよい。

【0022】本発明のニトリルヒドラターゼ遺伝子とは、ショードノカルディア・サーモフィラ由来の該遺伝子をその代表例として挙げることができる。より具体的には、配列表の配列番号：2に記載の714番目から1331番目までの塩基配列で表されるαサブユニットをコードする遺伝子および配列表の配列番号：2に記載の16番目から717番目までの塩基配列で表されるβサブユニットをコードする遺伝子が挙げられる。すなわち、基本的にはαサブユニットが618個の塩基配列により構成され、βサブユニットが702個の塩基配列により構成されているニトリルヒドラターゼであるが、組換えDNA技術の進歩により、該酵素のアミノ酸配列を実質的に変えることなく比較的容易に翻訳の際の錠型となるDNAの塩基配列を他の塩基配列で置換したり、翻訳の際の錠型となるDNAの塩基配列を置換、欠失、削

除もしくは挿入することにより、酵素の作用を実質的に変えることなくその構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除または挿入させることもできるようになった。かかる技術水準に鑑み、この発明でいうシードノカルディア・サーモフィラ由來のニトリルヒドラターゼ遺伝子とは、配列表の配列番号：2に記載の714番目から1331番目までの塩基配列で示される $\alpha$ サブユニットと配列表の配列番号：2に記載の16番目から717番目までの塩基配列で示される $\beta$ サブユニットをそのまま具備するものは言うにおよばず、そのDNA塩基配列の1個または2個以上の塩基が他の塩基に置換、欠失、削除もしくは挿入された部分変異配列であっても、それがニトリルヒドラターゼ活性を有するタンパク質の錠型として機能できる限りは本発明のシードノカルディア・サーモフィラ由來のニトリルヒドラターゼ遺伝子に包含されるものとする。

【0023】具体的には、特開平9-275978に示されたように、配列表の配列番号：2に記載の塩基配列の729番目から731番目、768番目から770番目、825番目から827番目、942番目から944番目、981番目から983番目、1017番目から1019番目、1029番目から1031番目、1089番目から1091番目、1101番目から1103番目、1137番目から1139番目、1149番目から1151番目、1272番目から1274番目、1293番目から1295番目、1320番目から1322番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列で表される $\alpha$ サブユニット遺伝子を構成要素として有しているニトリルヒドラターゼ遺伝子を挙げることができる。

【0024】すなわち、本発明においては、 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換して得られる $\alpha$ サブユニットを構成要素として有しているニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子が含まれる。

【0025】同様に、配列表の配列番号：2に記載の塩基配列の73番目から75番目、76番目から78番目、337番目から339番目、613番目から615番目、649番目から651番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列で表される $\beta$ サブユニット遺伝子を構成要素として有しているニトリルヒドラターゼ遺伝子を挙げることができる。

【0026】すなわち、本発明においては、 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目、212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換して得られる $\beta$ サブユニットを構成要素として有しているニトリルヒドラタ

ーゼをコードする遺伝子が含まれる。

【0027】また、本発明におけるニトリルヒドラターゼ遺伝子は、前述のシードノカルディア・サーモフィラ由來の該遺伝子に特に限定されるものではなく、本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質により活性化される場合には、他の微生物株由來のニトリルヒドラターゼ遺伝子も含まれる。そのような微生物株としては、ノカルディア(*Nocardia*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、バチルス(*Bacillus*)属、好熱性のバチルス属、シードモナス(*Pseudomonas*)属、ミクロコッカス(*Micrococcus*)属、ロドクロウス(*rhodochrous*)種に代表されるロドコッカス(*Rhodococcus*)属、アシネットバクター(*Acinetobacter*)属、キサントバクター(*Xanthobacter*)属、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属、リゾビウム(*Rhizobium*)属、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、エルウィニア(*Erwinia*)属、エアロモナス(*Aeromonas*)属、シトロバクター(*Citrobacter*)属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属およびサーモフィラ(*thermophila*)種JCM3095株以外のシードノカルディア(*Pseudonocardia*)属を好適な例として挙げができる。

【0028】本発明においては、前述の組換えプラスミドを任意の微生物宿主に導入して形質転換体を得ることが含まれる。この際には、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子、ニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニット遺伝子及び $\beta$ サブユニット遺伝子を同一のプラスミドベクター上に存在させた組換えプラスミドを使用してもよいし、各遺伝子を独立のプラスミドベクター上に存在させた複数の組換えプラスミドを同時に導入してもよい。また、ここでいう任意の宿主には、後述の実施例のように大腸菌(*Escherichia coli*)が代表例として挙げられるが、とくに大腸菌に限定されるのものではなく枯草菌(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物菌株も含まれる。その様なものの例として、MT-10822(本菌株は、1996年2月7日に茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM-BP-5785として、特許手続上上の微生物の寄託の国際的承認に関するプラベスト条約に基づいて寄託されている。)が挙げられる。

【0029】尚、外来遺伝子の発現に必要な領域を有するプラスミドベクターに本発明のニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質コードする遺伝子、および/または、シードノカルディア・サーモフィラ由來のニトリルヒドラターゼ遺伝子を挿入して本発明の組換えプラスミドを構築する方法、該組換えプラスミドを所望の宿主に形質転換する際には、「Molecular Cloning 2nd Edition」(T. Maniatisら; Cold Spring Harbor Labo

ratory Press, 1989) 等に記載されている遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法を参考にすればよい。

【0030】本発明においては、ニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子とニトリルヒドラターゼ遺伝子を同時に任意の宿主に導入し、得られた形質転換体を一般的な栄養培地で培養して該酵素を産生させ、該酵素を産生している該形質転換株、該形質転換株の培養液、該形質転換株の培養液より得られる形質転換菌体、該形質転換菌体の菌体処理物を調製し、水性媒体中にそれらとニトリル化合物を接触させて対応するアミド化合物を製造することが含まれている。該形質転換株の調製に際しては、分子生物学・生物工学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法を利用して調製すればよい。たとえば、LB培地やM9培地等の通常液体培地（より好ましくはそのような培地成分にFeイオン及びCoイオンを0.1 μg/ml以上存在させるとよい）に該形質転換株を植菌した後、適当な培養温度（一般的には、20°C～50°C）で生育させればよい。また、該培養液そのものや、該培養液より遠心分離によって分離・回収して得られる形質転換菌体、該形質転換菌体の菌体処理物を利用することもできる。ここでいう菌体処理物とは、該形質転換菌体の抽出物や磨碎物、該抽出物や磨碎物のニトリルヒドラターゼ活性画分を分離・精製して得られる後分離物、該形質転換菌体や該形質転換菌体の抽出物・磨碎物・後分離物を適当な担体を用いて固定化した固定化物のことである。また、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する場合のニトリル化合物としては、本発明のニトリルヒドラターゼが基質として作用できる化合物であれば特に限定されないが、好ましくはアセトニトリル、プロピオニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、n-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、クロトノニトリル、

培地組成 酵母エキストラクト  
ポリペプトン  
NaCl  
塩化コバルト・六水和物  
硫酸第二鉄・七水和物  
pH 7.5

【0034】該湿菌体よりアルカリ SDS 抽出法により pPT-DB1 [図-1 (図1)] のプラスミドDNAを調製し、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 373A を用いてプライマーエクステンション法により挿入断片の全塩基配列を決定した。その結果、挿入断片中に 705 bp、621 bp および 435 bp の塩基配列からなるオープンリディングフレーム（各々 ORF1、ORF2、ORF3 と呼ぶ）が 5' 末端側よりこの順番で確認され、また、それぞれの転写方向も完全に一致していた。翻訳停止コドンを含めた ORF1 の最も 3' 末端側の 4 塩基と ORF2 の最も 5'

α-ヒドロキシイソブチロニトリル、エチレンシアノヒドリン、スマロニトリル、マロノニトリル、ベンゾニトリル、マンデロニトリル、シアノピラジン、3-シアノピリジン等のニトリル化合物がその代表例として挙げられる。該ニトリル化合物の水性媒体中での濃度は、特に限定されるものではなく、また、反応温度も特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラターゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは 0°C～50°C である。

### 【0031】

【実施例】以下の実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。尚、各実施例及び比較例におけるHPLC分析は、カラムとして日本分光製の Finepeak SIL C18-5 (250×4.6 mm) を用い、4体積%のアセトニトリルを含む 10 mM リン酸水溶液を展開液として使用した。また、アクリルアミド、アクリロニトリル、アクリル酸は 210 nm の吸光度により検出した。

【0032】[実施例1] MT-10822 株の挿入断片の解析 (1)

500 ml のバッフル付三角フラスコに下記の組成の培地 100 ml を調製し、121°C・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822 株 (FERM BP-5785) を一白菌耳植菌し、37°C・130 rpm にて 16 時間培養した。遠心分離 (15000 G × 15 分間) により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50 ml の生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

### 【0033】

5.0 g/L
10.0 g/L
5.0 g/L
10.0 mg/L
40.0 mg/L

末端側の 4 塩基は重複し、同様に翻訳停止コドンを含めた ORF2 の最も 3' 末端側の 4 塩基と ORF3 の最も 5' 末端側の 4 塩基は重複していた。尚、特開平9-275978 にて既に示されたように、ORF1 はニトリルヒドラターゼの β サブユニット遺伝子であり、ORF2 は α サブユニット遺伝子である。

【0035】次に、ORF1 から ORF3 までの全領域を再クローニングするために、pPT-DB1 プラスミドDNA を錆型として PCR を実施した。pPT-DB1 のプラスミドDNA 1 μg を錆型として、配列表の配列番号 3 記載のプライマー及び配列表の配列番号 4 記載

プライマーを各々 100 pmol と *Taq* DNA ポリメラーゼを 5 U を含む全量 100 μl の系で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応の反応終了液 10 μl を用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.8 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、約 1.8 kb の増幅 DNA 産物の存在が確認できた。統いて、アガロースゲルから約 1.8 kb の DNA 断片のみを切り出し、該アガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 ml の TE 液に懸濁後、55°C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った。まず、TE (1 mM の EDTA · 2 Na を含む 10 mM のトリス塩酸水溶液; pH 8.0) で飽和させたフェノール液 1 ml を加え緩やかにかくはんした。遠心分離 (3000 rpm, 10 分) により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を 3 回繰り返した後、得られた水相に上記の TE 飽和フェノール液 0.4 ml とクロロホルム 0.4 ml を加えて再び緩やかにかくはんした後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分) により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム 0.8 ml を加えて再び緩やかにかくはんした後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分) により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に 1.1 M の NaCl を含む TE 液 80 μl とエタノール 1.7 ml を加えて -80°C で 30 分間放置した後、遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4°C) により DNA 断片の沈殿を回収した。該 DNA 断片を風乾後、最終的に 10 μl の TE に溶解した。精製した約 1.8 kb の増幅 DNA 断片を制限酵素 *Eco* RI 及び *Sph* I により切断した後、この制限酵素処理液に対して上記と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って該 DNA 断片を再度精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。同様に、*puc* 18 ベクター上の唯一の制限酵素サイトである *Eco* RI および *Sph* I により同ベクターを切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.7%）を行い、アガロースゲルから約 2.7 Kb の DNA 断片のみを切り出した。切りだしたアガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 ml の TE 液に懸濁後、55°C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して上述と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。この様にして得られた増幅 DNA 産物と *puc* 18 断片を DNA ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミド pPT-D 1 [図-2 (図 2)] を構築した。また、構築さ

れた pPT-D 1 の *Eco* RI 部位から *Sph* I 部位間の挿入断片の全塩基配列を配列表の配列番号 2 に記載した。

【0036】東洋紡績社製の大腸菌 HB 101 のコンピュートセルを用いて pPT-D 1 を HB 101 株に導入し、形質転換菌株 No. 1 を得た。500 ml のバッフル付き三角フラスコに上述と同じ組成の LB 液体培地を調製し、121°C · 20 分間のオートクレープにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株 No. 1 を一白菌耳植菌し、37°C · 130 rpm にて約 20 時間培養した。遠心分離 (5000 G × 15 分) により菌体のみを培養液より分離し、統いて、50 ml の生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体 100 mg を 200 ml の 50 mM のリン酸カリウム水溶液 (pH 7.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 10 ml 添加し、10°C にて緩やかにかくはんしながら 1 時間反応を行った。反応終了後、実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドのみが存在しており、アクリロニトリル及びアクリル酸は認められなかった。すなわち、転化率及び選択性は 100% であった。

【0037】[比較例 1] MT-10822 株の挿入断片の解析 (2)

ORF 1 から ORF 3 の途中までの領域を再クローニングするために、pPT-DB 1 プラスミド DNA を鋳型として PCR を実施した。実施例 1 で調整した pPT-DB 1 のプラスミド DNA 1 μg を鋳型として、配列表の配列番号 3 記載のプライマー及び配列表の配列番号 5 記載プライマーを各々 100 pmol と *Taq* DNA ポリメラーゼを 5 U を含む全量 100 μl の系で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応の反応終了液 10 μl を用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.9 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、約 1.6 kb の増幅 DNA 産物の存在が確認できた。統いて、アガロースゲルから約 1.6 kb の DNA 断片のみを切り出し、該アガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 ml の TE 液に懸濁後、55°C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例 1 と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、増幅 DNA 断片を精製した。精製した約 1.6 kb の増幅 DNA 断片を制限酵素 *Eco* RI 及び *Sph* I により切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例 1 と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って該 DNA 断片を再度精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。この様にし

て得られた増幅DNA産物と実施例1で調整した約2.7 kbpのpUC18のEcoRI-SphI断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドpPT-E1【図-3(図3)】を構築した。

【0038】東洋紡績社製の大腸菌HB101のコンピテントセルを用いてpPT-E1をHB101株に導入し、形質転換菌株No.2を得た。500mlのバッフル付き三角フラスコに実施例1と同じ組成のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株No.2を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。遠心分離(5000G×15分)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体100mgを200mlの50mMのリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを10ml添加し、10℃にて緩やかにかくはんしながら1時間反応を行った。反応終了後、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドは認められず、未反応アクリロニトリルのみが認められた。また、アクリル酸も認められなかつた。すなわち、転化率及び選択性は0%であった。一方、培養液より分離された菌体内には、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼのαおよびβサブユニットに相当するポリペプチド鎖の存在が確認された。

#### 【0039】[比較例2] MT-10822株の挿入断片の解析(3)

ORF1からORF2までの全領域を再クローニングするために、pPT-DB1プラスミドDNAを雑型としてPCRを実施した。実施例1で調整したpPT-DB1のプラスミドDNA1μgを雑型として、配列表の配列番号3記載のプライマー及び配列表の配列番号6記載プライマーを各々100pmolとTaq DNAポリメラーゼを5Uを含む全量100μlの系で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応の反応終了液液10μlを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.9重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.3kbpの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約1.3kbpのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1g)を細かく粉碎し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノー

ル沈殿を行い、増幅DNA断片を精製した。精製した約1.3kbpの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びSphIにより切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例1と同様のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って該DNA断片を再度精製し、最終的に10μlのTEに溶解した。この様にして得られた増幅DNA産物と実施例1で調整した約2.7kbpのpUC18のEcoRI-SphI断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドpPT-F1【図-4(図4)】を構築した。

【0040】東洋紡績社製の大腸菌HB101のコンピテントセルを用いてpPT-F1をHB101株に導入し、形質転換菌株No.3を得た。500mlのバッフル付き三角フラスコに実施例1と同じ組成のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られた形質転換菌株No.3を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。遠心分離(5000G×15分)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体100mgを200mlの50mMのリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを10ml添加し、10℃にて緩やかにかくはんしながら1時間反応を行った。反応終了後、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドは認められず、未反応アクリロニトリルのみが認められた。また、アクリル酸も認められなかつた。すなわち、転化率及び選択性は0%であった。一方、培養液より分離された菌体内には、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼのαおよびβサブユニットに相当するポリペプチド鎖の存在が確認された。

#### 【0041】[比較例3] MT-10822株の挿入断片の解析(4)

ORF3の全領域を再クローニングするために、pPT-DB1プラスミドDNAを雑型としてPCRを実施した。実施例1で調整したpPT-DB1のプラスミドDNA1μgを雑型として、配列表の配列番号7記載のプライマー及び配列表の配列番号4記載プライマーを各々100pmolとTaq DNAポリメラーゼを5Uを含む全量100μlの系で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応の反応終了液液10μlを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度1.2重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約450bpの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約

450 bp の DNA 断片のみを切り出し、該アガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 ml の TE 液に懸濁後、55°C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例 1 と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い、増幅 DNA 断片を精製した。精製した約 450 bp の増幅 DNA 断片を制限酵素 Eco RI 及び Sph I により切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例 1 と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を再度精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。この様にして得られた増幅 DNA 産物と実施例 1 で調整した約 2.7 kb p 的 puc18 的 Eco RI - Sph I 断片を DNA ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミド p PT-G1 [図-5 (図 5)] を構築した。

【0042】東洋紡績社製の大腸菌 HB 101 のコンピューテントセルを用いて p PT-G1 を HB 101 株に導入し、形質転換菌株 No. 4 を得た。500 ml のバッフル付き三角フラスコに実施例 1 と同じ組成の LB 液体培地を調製し、121°C・20 分間のオートクレープにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようにアンビシリンを添加した後、得られた形質転換菌株 No. 4 を一白菌耳植菌し、37°C・130 rpm にて約 20 時間培養した。遠心分離 (5000 G × 15 分) により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50 ml の生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体 100 mg を 200 ml の 50 mM のリン酸カリウム水溶液 (pH 7.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 10 ml 添加し、10°C にて緩やかにかくはんしながら 1 時間反応を行った。反応終了後、実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドは認められず、未反応アクリロニトリルのみが認められた。また、アクリル酸も認められなかつた。すなわち、転化率及び選択率は 0% であった。

#### 【0043】[実施例 2] MT-10822 株の挿入断片の解析 (5)

p PT-G1 プラスミドの ORF3 領域の 3' 末端側に、比較例 1 で作製した p PT-F1 の lacZ プロモーター、βサブユニットの ORF2、αサブユニットの ORF1 を含む領域をクローニングした。比較例 1 で調整した p PT-F1 のプラスミド DNA 1 μg を鉛型として、配列表の配列番号 8 記載のプライマー及び配列表の配列番号 9 記載プライマーを各々 100 pmol と Taq DNA ポリメラーゼを 5 U を含む全量 100 μl の系で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応の反応終了液 10 μl を用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用；アガロース濃

度 0.8 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、約 2.0 kb p の増幅 DNA 産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約 2.0 kb p の DNA 断片のみを切り出し、該アガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 ml の TE 液に懸濁後、55°C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例 1 と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い、増幅 DNA 断片を精製した。精製した約 2.0 kb p の増幅 DNA 断片を制限酵素 Sph I 及び Hind III により切断した後、この制限酵素処理液に対して実施例 1 と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を再度精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。同様に、p PT-G1 プラスミド上の唯一の制限酵素サイトである Sph I 及び Hind III により同プラスミドを切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V II 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.7%）を行い、アガロースゲルから約 3.1 kb p の DNA 断片のみを切り出した。切りだしたアガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 ml の TE 液に懸濁後、55°C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して実施例 1 と同様のフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μl の TE に溶解した。この様にして得られた増幅 DNA 産物と p PT-G1 の Sph I - Hind III 断片を DNA ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミド p PT-H1 [図-6 (図 6)] を構築した。

【0044】東洋紡績社製の大腸菌 HB 101 のコンピューテントセルを用いて p PT-H1 を HB 101 株に導入し、形質転換菌株 No. 5 を得た。500 ml のバッフル付き三角フラスコに上述と同じ組成の LB 液体培地を調製し、121°C・20 分間のオートクレープにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようアンビシリンを添加した後、得られた形質転換菌株 No. 5 を一白菌耳植菌し、37°C・130 rpm にて約 20 時間培養した。遠心分離 (5000 G × 15 分) により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50 ml の生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体 100 mg を 200 ml の 50 mM のリン酸カリウム水溶液 (pH 7.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 10 ml 添加し、10°C にて緩やかにかくはんしながら 1 時間反応を行った。反応終了後、実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中にはアクリルアミドのみが存在しており、アクリロニトリル及びアクリル酸は認められなかつた。すなわち、転化率及び選択率は 100% であった。

#### 【0045】

【発明の効果】本発明により、シュードノカルディア・

サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関するニトリルヒドラターゼ活性化タンパク質およびそれをコードする遺伝子配列が提供される。さらに、本発明により、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該遺伝子およびニトリルヒドラターゼ遺伝子を含有する組換えプラスミド、該組換えプラスミドにより形質転換された形質転換株、及び、該形質転換株を培養して得られる培養液・菌体・菌体処理物を用いて、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法が提供される。また、本発明によれば、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造する際に、遺伝子工学的な手法で該酵素を大量に発現させることが可能となり、これよりアミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストの削減が達成される。

#### 【0046】

##### 【配列表】

###### 配列

<u>Met</u>	Ser	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Leu	Lys	His	Cys	Pro	Thr	Ala	Glu
5															
Asp	Arg	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Pro	Gly	Gly	Asp
20															
Arg	Ala	Leu	Asp	Arg	Gly	Phe	Asp	Glu	Pro	Trp	Gln	Leu	Arg	Ala	Phe
35															
Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Ala	Cys	Arg	Ala	Gly	Arg	Phe	Glu	Trp	Lys	Gln
50															
Leu	Gln	Gln	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser	Ile	Gly	Glu	Trp	Glu	Arg	Thr	His
65															
Asp	Leu	Asp	Asp	Pro	Ser	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Glu	His	Phe	Val	Ala	Ala
85															
Leu	Glu	Ser	Val	Leu	Gly	Glu	Glu	Gly	Ile	Val	Glu	Pro	Glu	Ala	Leu
100															
Asp	Glu	Arg	Thr	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Asn	Pro	Pro	Asn	Lys	Asp	His
115															
His	Gly	Pro	His	Leu	Glu	Pro	Val	Ala	Val	His	Pro	Ala	Val	Arg	Ser
130															

#### 【0048】配列番号：2

配列の長さ：1762

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Pseudonocardia thermophilic

株名：JCM3095

直接の起源

###### 配列

TGAGAGGAGC	TCCGCATGAA	CGGCGTGTAC	GACGTGGCG	GCACCGATGG	GCTGGGCCG	60
ATCAACCGGC	CCGGCGGACGA	ACCGGTCTTC	CGCGCCGAGT	GGGAGAAGGT	CGCGTTCGCG	120

#### 【0047】配列番号：1

配列の長さ：144

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：Pseudonocardia thermophilic

株名：JCM3095

直接の起源

クローリン名：pPT-DB1

配列の特徴

特徴を決定した方法：E

他の情報：シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関するタンパク質のアミノ酸配列を示す。

ATGTTCCGG	CGACGTTCCG	GGCCGGCTTC	ATGGGCTGG	ACGAGTTCCG	GTTGGCATH	180
GAGCACATGA	ACCCGGCGGA	GTACCTCGAG	TGCGCGTACT	ACTGGCACTG	GATCCGCACC	240
TACATCCACC	ACGGCGTCCG	CACCGGCAAG	ATCGATCTCG	ACGAGCTCGA	GCGCCGCCACG	300
CACTACTACC	GGGAGAACCC	CGACGCCCGG	CTGCCCCAGC	ACGAGCAGAA	GCCGGAGTTG	360
ATCGAGTTCG	TCAACCAGGC	CGTCTACCGC	GGGCTGCCCG	CAAGCCGGGA	GGTGACCGA	420
CGGCCCAAGT	TCAAGGAGGG	CGACGTGGTG	CGGTTCTCCA	CGCGAGGCC	GAAGGGCCAC	480
GCCCGGCGCG	CGCGGTACGT	CGCGGGCAAG	ACCGGGACGG	TGGTCAAGCA	CCACGGCGCG	540
TACATCTACC	CGGACACCGC	CGGCAACCGC	CTGGGGAGT	GCCCCGAGCA	CCTCTACACC	600
GTCCGCTTCA	CGGCCCAAGG	GCTCTGGGG	CGGGAAGGGG	ACCCGAACTC	CACCGTCTAC	660
TACGACTGCT	GGGAGGCCCTA	CATCGAGCTC	GTOGACACGA	AGGCGGCCGC	GGCATGACCG	720
AGAACATCCT	GGCCAACCTCG	GACGAGGAGA	TCCAGAAGGA	GATCACCGCG	CGGGTCAAGG	780
CCCTGGAGTC	GATGCTCATC	GAACAGGGCA	TCCTCACCAC	GTCGATGATC	GACCCGATGG	840
CCGAGATCTA	CGAGAACGAG	GTCGGCCCGC	ACCTCGGCCG	GAAGGGTGT	GTAAGGCCT	900
GGACCGACCC	CGAGTTCAAG	AAGCGCTCTGC	TCGCCCACGG	CACCGAGGGC	TCCAAGGAGC	960
TCGGCATCGG	CGGCCCTCGAG	GGCGAGGACA	TGATGTGGGT	GGAGAACACC	GACGAGGTCC	1020
ACCACTCGT	CGTGTGACCG	CTCTGCTCT	GCTACCCGTG	CGCGGTGCTG	GGGCTGCCGC	1080
CGAACTGGTT	CAAGGAGCCG	CAGTACCGCT	CCCGCGTGGT	GGGTGAGGCC	CGGCAGCTGC	1140
TCAAGGAGGA	GTTCGGCTTC	GAGGTCCCCG	CGAGCAAGGA	GATCAAGGTC	TGGGACTCCA	1200
GCTCCGAGAT	CGCCTTCGTC	GTCCCTCCGC	AGCGCCCGC	GGGCACCGAC	GGGTGGAGCG	1260
AGGAGGAGCT	CGCCACCCCTC	GTCACCCCGC	AGTCGATGAT	CGGCCTCGAA	CCCGCGAAGG	1320
CGGTCGCGTG	AGCGCCGAGG	CGAAGGTCCG	CCTGAAGCAC	TGCCCCACGG	CCGAGGACCG	1380
GGCGGGCGCC	GACCGCGCTGC	TCGCGCAGCT	GCCCCGGCGC	GACCCGCGC	TGACCCCGG	1440
CTTCGACGAG	CCGTGGCAGC	TGCGGGCGTT	CGCGCTGGCG	GTGCGGGCGT	GCAGGGCGGG	1500
CCGGTTCGAG	TGGAAGCAGC	TGCAGCAGGC	GCTGATCTCC	TCGATCGGGG	AGTGGGAGCG	1560
CACCCACGAT	CTCGACGATC	CGAGCTGGTC	CTACTACGAG	CACTTGTGCG	CCGGCTGGA	1620
ATCCGTGCTC	GGCGAGGAAG	GGATGCTCGA	GCCGGAGGCC	CTGGACGAGC	GCACCGCGGA	1680
GGTCTTGGCC	AACCCGCCGA	ACAAGGATCA	CCATGGACCG	CATCTGGAGC	CCGTCCGGGT	1740
CCACCCGGCC	GTGGGTCTCT	GA				1762

【0049】配列番号：3

配列の長さ：29

配列の型：核酸

配列

CGAATTCTGA GAGGAGCTCC GCATGAACG

29

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0050】配列番号：4

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

TGCATGCTCA CGACCGCACG GCCGGGTG

28

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0051】配列番号：5

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

TGCATGCTCA GATCGAGGAG ATCAGCGC

28

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0052】配列番号：6

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

TGCATGCTCA CGCGACCGCC TTGCGCGG

28

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0053】配列番号：7

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CGAATTCTGA GAGGAGCTCC CGGTGAGCGC CGAGGCCAAG GTCCC

【0054】配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

TGCATGCCAT TAATGCAGCT GGCACGA

【0055】配列番号：9

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

TAAGCTTTCA GATCGAGGAG ATCAGCGC

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpPT-DB1の制限酵素切断点地図を示す。

【図2】プラスミドpPT-D1の制限酵素切断点地図を示す。

【図3】プラスミドpPT-E1の制限酵素切断点地図を示す。

【図4】プラスミドpPT-F1の制限酵素切断点地図を示す。

【図5】プラスミドpPT-G1の制限酵素切断点地図を示す。

【図6】プラスミドpPT-H1の制限酵素切断点地図を示す。

【符号の説明】

b1a : β-ラクタマーゼをコードする遺伝子を示す。

ColE1-ori : ColE1系の複製開始部位を示す。

配列の種類：他の核酸 合成DNA

45

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

27

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

28

す。

lacZ : pUC18由來のラクトースオペロンのプロモーターおよびオペレーター領域を示す。

NH $\alpha$  : シュードノカルディア・サーモフィラ由來のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子を示す。

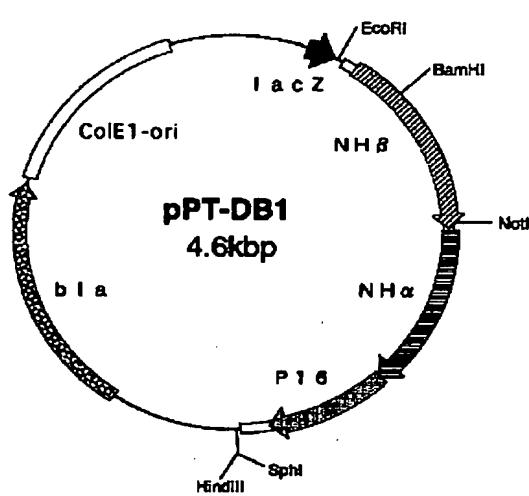
NH $\beta$  : シュードノカルディア・サーモフィラ由來のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子を示す。

P16 : シュードノカルディア・サーモフィラ由來のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子を示す。

P16(一部) : シュードノカルディア・サーモフィラ由來のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子の部分領域であることを示す。

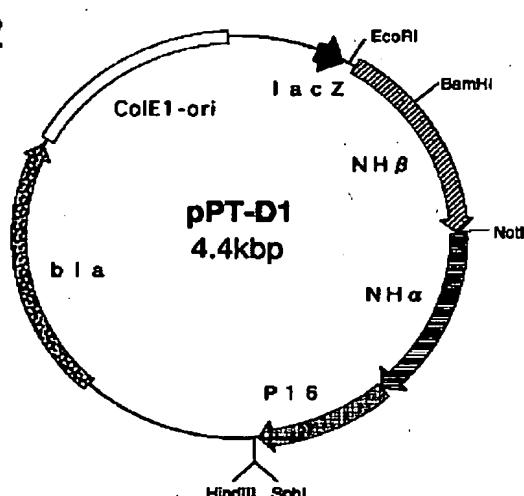
【図1】

図-1



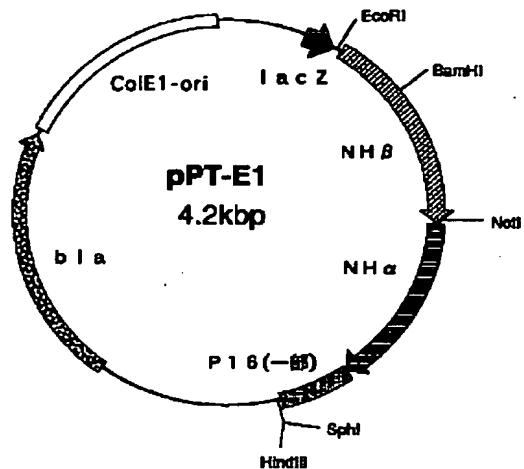
【図2】

図-2



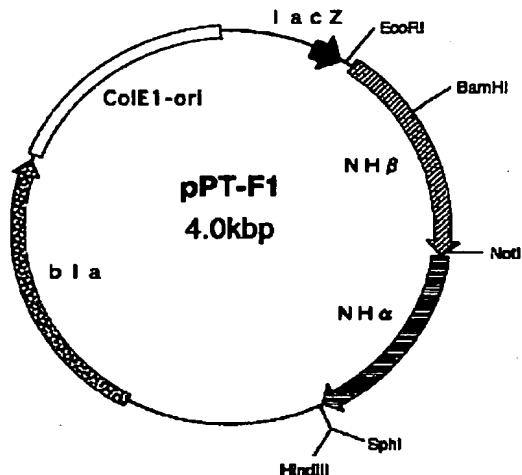
【図3】

図-3



【図4】

図-4



【図5】

図-5

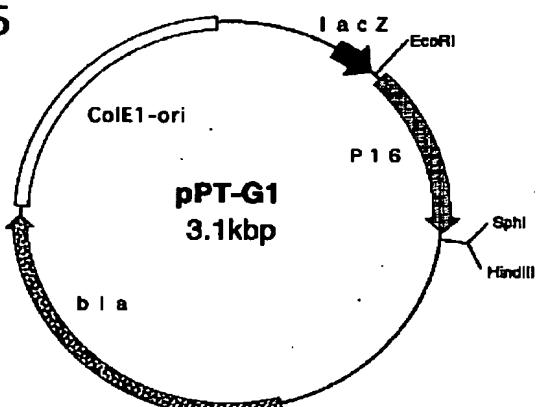
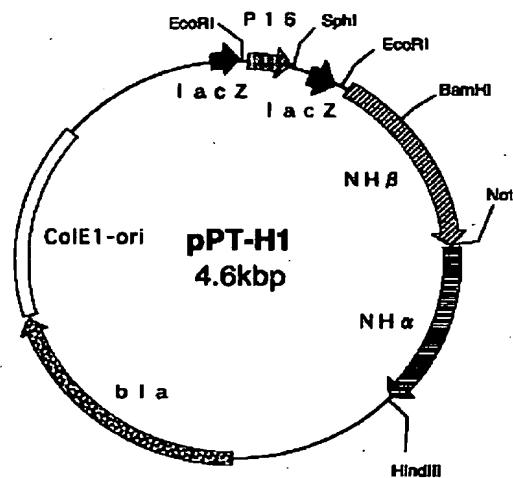


図-6



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6  
//(C 1 2 N 15/09  
C 1 2 R 1:01)  
(C 1 2 N 1/21  
C 1 2 R 1:19)

識別記号  
ZNA

F I

(72) 発明者 肉丸 誠也  
千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式  
会社内

(72) 発明者 中村 武史  
千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式  
会社内